

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-516036

(P2004-516036A)

(43) 公表日 平成16年6月3日(2004.6.3)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/22	A 6 1 P 25/22	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-553115 (P2002-553115)	(71) 出願人	391008951 アストラゼネカ・アクチエボラーグ
(86) (22) 出願日	平成13年12月19日 (2001.12.19)		スウェーデン国エス-15185-セーデル テイエ (番地なし)
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月20日 (2003.6.20)	(74) 代理人	100091731 弁理士 高木 千嘉
(86) 国際出願番号	PCT/SE2001/002854	(74) 代理人	100080355 弁理士 西村 公佑
(87) 国際公開番号	W02002/052267	(74) 代理人	100110593 弁理士 杉本 博司
(87) 国際公開日	平成14年7月4日 (2002.7.4)	(72) 発明者	サルタン・アーマッド カナダ国ケベックH4S 1Z9. サンロ ーラン. フレデリック・バンティング71 71. アストラゼネカ・アール・アンド・ ディー・モンリオール
(31) 優先権主張番号	60/257,977		最終頁に続く
(32) 優先日	平成12年12月22日 (2000.12.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 MAS 受容体に結合するダイノルフィンAのアゴニストまたはアンタゴニストを分析する方法

(57) 【要約】

本発明は、ダイノルフィンAおよびその類似体のアゴニストまたはアンタゴニストまたはインパースアゴニストとして作用する化合物をスクリーニングするのに用いることができる分析法に係るものである。当該分析法は、ダイノルフィンAおよびその類似体の、ラットおよびヒトMAS受容体への結合に基づく。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) ダイノルフィン A およびその類似体、ならびに試験化合物と共に、M A S 受容体遺伝子を発現する細胞をインキュベートすること；および、
b) 上記ダイノルフィン A およびその類似体の結合が上記試験化合物でどの程度置き換えられたかを測定すること、
を含む、ラットおよびヒト M A S 受容体に結合する能力に関して試験化合物を分析する方法。

【請求項 2】

ラット/ヒト M A S 受容体を発現する細胞は、異種 M A S 受容体遺伝子で形質転換された組換え細胞である請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

分析は放射性リガンド分析であり、ダイノルフィン A およびその類似体または試験化合物は放射活性により標識された請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

分析が酵素結合免疫吸着分析 (E L I S A) であり、ダイノルフィン A およびその類似体または試験化合物のいずれかが酵素に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

試験化合物が、細胞のホスホリパーゼ C または細胞内カルシウム濃度を顕著に増加または減少させるかどうかを測定することをさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 6】

試験化合物がダイノルフィン A およびその類似体のアゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストかどうかを決定する方法であって、

a) 上記試験化合物と共に、M A S 受容体を発現する細胞をインキュベートすること；
b) 工程 a) のインキュベーション中における上記細胞の、細胞内のホスホリパーゼ C またはアデニルシクラーゼ活性または細胞内カルシウム濃度を測定すること；
c) 工程 b) で得られた結果と、上記試験化合物の非存在下でインキュベーションを行った場合に得られた結果とを比較すること；および、
d) ホスホリパーゼ C もしくはアデニルシクラーゼ活性または細胞内のカルシウムのレベルが、上記試験化合物の存在下において、それが存在しない場合よりも顕著に高いならば、上記試験化合物がダイノルフィン A およびその類似体のアゴニストであると結論付けること、または、ホスホリパーゼ C またはアデニルシクラーゼ活性または細胞内カルシウム濃度のレベルが、上記試験化合物の存在下において、それが存在しない場合よりも顕著に低いならば、上記試験化合物がダイノルフィン A およびその類似体のアンタゴニストであると結論付けること、
を含む、上記方法。 30

【請求項 7】

細胞は、異種 M A S 受容体遺伝子 (ラットおよびヒト) で形質転換された組換え細胞である請求項 6 に記載の方法。 40

【請求項 8】

M A S 受容体を発現する細胞と試験化合物とが、ダイノルフィン A およびその類似体をさらに含む培地中でインキュベートされる、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の分野】

本発明は、試験化合物が、ヒト M A S 受容体でダイノルフィン A および類似体の結合および活性をモジュレートするのに使用可能かどうかを決定するのに用いることができる分析方法に関する。有効なモジュレーターと同定された化合物は、痛み、神経性の障害および炎症性の障害、学習障害および記憶障害、不安障害、同様に、心臓血管機能の調節を治療 50

する治療剤として使用可能である。

【0002】

【発明の背景】

A. ダイノルフィンA

ダイノルフィンAは、内在的に効力のあるオピオイドペプチドとして1979年に発見された(PNAS, USA 76:6666-6670:1979)。ダイノルフィンの薬理的な作用はきわめて広範である。ダイノルフィンAおよび関連ペプチドは、ICVに投与される場合に、非熱的かつ力学的な無痛においてそこそこ有効であることがわかっており(Dubner, R., Trends Neurosci. 15:96-103, 1992)、ガン患者における難治性の痛みを治療する診療所で用いられてきた(Wen, H.L., Central and peripheral endorphins: basic and clinical aspects, New York: Raven Press; 1993:319-323)。ダイノルフィンはまた、中枢神経系および末梢神経系を介して心臓血管系に作用することがわかっている(Dumont, M. 37:1-33, 1996)。その上、ダイノルフィンAは免疫調製活性を有する。マウスに投与した場合、ダイノルフィンAはマウスの腹腔マクロファージの食細胞活動を増強した。この食細胞作用は、非オピオイド受容体の関与を示唆するナロキソン処理によって阻害されなかった(J. Neuroimmunol. 60:37-43, 1995)。

【0003】

ダイノルフィンAは、オピオイド受容体に選択性を有する効力のあるオピオイドペプチドとして初めに記載されたにもかかわらず、その病理学的および生理学的な作用のいくつかは、非オピオイド受容体により媒介される、ということが提案されている。従って、本明細書において、ダイノルフィンAがMAS受容体を活性化し結合することができるということを、本発明者等が初めて説明した。

【0004】

ヒトMAS腫瘍遺伝子受容体が、ヌードマウスの腫瘍形成性分析(tumorigenicity assay)によって1986年に初めて単離された(Young, M., Cell, 45:711-719, 1986)。この受容体は、7回膜貫通ドメインタンパク質に関してコードしており、例えばNPYモチーフが第7膜貫通ドメイン中にあるように、そのコーディング配列内にホールマーク特徴が存在する。MAS受容体は、海馬、皮質、小脳、梨状皮質および嗅球で観察されたmRNAの最も高いシグナル状態で、腹神経系(CNS)において発現される。この受容体に関するmRNAはまた、精巣、腎臓および心臓などの末梢組織で検出されている(FEBS Letters, 357, 27-32, 1995)。MAS受容体の発現は、発生およびニューロン活性の際に高度に調節される。興味深いことには、MAS癌原遺伝子を欠くマウスは、不安の増強を示しただけでなく、海馬の全般的な形態学に影響を与えることなく長期増強も延長させた(JBC, 273, 11867-11873, 1998)。

【0005】

従って、アゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストとしてMAS受容体を標的にした薬剤は、長期に渡る記憶の神経障害的な病気や炎症性の病気と同様に、心臓血管の機能障害の問題を治療するのに用いられる可能性を秘めている。

【0006】

B. Gタンパク質共役受容体

Gタンパク質共役受容体(GPCR)は、細胞外のN末端、膜貫通ドメインを構成すると推測される7個の疎水性ヘリックス、および、細胞内のC末端ドメインを特徴とする共通の構造的機構を共有するタンパク質ファミリーを構成する。GPCRは、Gタンパク質を変化させる活性化を介して細胞内シグナルを引き起こす多種多様なリガンドと結合する(Caron, et al., Rec. Prog. Horm. Res. 48:277-290(1993); Freedman, et al., Rec. Prog. Horm. Res. 51:319-353(1996))。

【0007】

これまで300種以上のGPCRがクローン化されており、一般的に、1,000種をはるかに上回るこのような受容体が存在すると考えられている。全ての臨床的に適切な薬剤の約50~60%が、様々なGPCRの機能を調整することによって作用する(Gudermann, et al., J. Mol. Med. 73: 51-63 (1995))。多くの臨床的に適切な受容体は中枢神経系に位置する。

【0008】

同定およびクローン化されたGPCRのなかでも、DRR/RTAファミリーの受容体と相同なタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。本発明者等は、この受容体をMAS受容体と呼び、ヒトに存在する場合の遺伝子構造を説明した。しかしながら、この受容体ファミリーに対する内因性のリガンドは、これまで同定されていない(Cell: 45, 711-719 1986, JBC 273, 11867-11873 1998, WO99/32519)。

10

【0009】

【発明の要約】

本発明は、ダイノルフィンAおよびその類似体(ダイノルフィンA-アミドおよびダイノルフィン1~13)が、ラットおよびヒトMAS受容体を活性化するという発見に基づく。ラットまたはヒトMAS受容体のいずれかを発現する組換え細胞は、アゴニスト、インバースアゴニストおよびアンタゴニストを同定するために設計されたスクリーニング分析において、ダイノルフィンAおよびその類似体と組み合わせることができる。従って、その第一の観点において、本発明は、MAS受容体に結合する能力に関して試験化合物を分析する方法に係るものである。これは、受容体遺伝子を発現する細胞または膜を、ダイノルフィンAおよびその類似体と、試験化合物と共にインキュベートすることによって達せられる。次に、ダイノルフィンAおよびその類似体の結合がどの程度置き換えられたかを測定する。放射性リガンドまたは酵素結合免疫吸着分析を行ってもよく、この場合、ダイノルフィンAおよびその類似体、または試験化合物のいずれかが検出可能なように標識される。MAS受容体を発現する細胞ならいずれも使用可能であるが、ラットまたはヒトのいずれかから得られた異種MAS受容体遺伝子を発現する組換え細胞が好ましい。本明細書で用いられる「異種」という用語は、細胞にトランスフェクトした全てのMAS受容体遺伝子を意味し、すなわち、当該用語は、全ての非内因性のMAS受容体を意味する。

20

30

【0010】

また、本発明は、試験化合物が、ダイノルフィンAおよびその類似体に結合するアゴニスト、アンタゴニスト、または、インバースアゴニストかどうかを、機能分析に基づき決定する方法を含む。このような分析を実行する一つの方法は、MAS受容体を発現する細胞を、試験化合物と共にインキュベートし、次に、細胞内のホスホリパーゼC、アデニルシクラーゼ活性または細胞内カルシウム濃度がモジュレートされているかどうかを測定することである。結果は、通常、試験化合物の非存在下という以外は同様の方法でインキュベーションした場合に得られた結果と比較するべきである。一般的に、このタイプの機能分析は、上述したような結合分析と組み合わせられて実行される。当該分析に好ましく用いられる細胞は、MAS受容体遺伝子で形質転換された組換え細胞である。アゴニストとして作用する試験化合物は、ホスホリパーゼCの増加、アデニルシクラーゼ活性の減少もしくは増加、または、細胞内のカルシウムレベルの増加を生じさせるべきである。特に、定量のダイノルフィンAおよびその類似体の存在下で分析が行われる場合、インバースアゴニストは、ホスホリパーゼC活性または細胞内のカルシウムレベルを減少させ得る。アンタゴニストは、ダイノルフィンAおよびその類似体の受容体への結合をブロックするべきであるが、インバースアゴニストのホールマークであるホスホリパーゼC活性または細胞内のカルシウムの点に関して反対の応答は生じさせない。

40

【0011】

【発明の詳述】

50

本発明は、ダイノルフィンAおよびその類似体と、ラットおよびヒトMAS受容体との結合をモジュレートする能力に関して化合物をスクリーニングするのに用いることができる分析に係るものである。ダイノルフィンAおよびその類似体またはフラグメントの全ての形態を用いることができる(ダイノルフィンA: YGGFLRRIRPKLKW D N Q - C O O H または N H₂)。これらペプチドは、市販品を得てもよいし(例えばBacchem, American Peptide Company)、または、当業界周知の標準的な方法論を用いて合成してもよい。当該ペプチドは、検出可能なように¹²⁵Iのような放射性同位体で標識してもよく、またあるいは、蛍光性もしくは化学発光法による標識を取り込ませてもよい。また、当該ペプチドは、容易に検出できる酵素(例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ)に結合させることもできる。

10

【0012】

MAS受容体は、Young, M., Cell, 45: 711 - 719, 1986で説明された方法を用いて、ラットおよび/またはヒト細胞/組織からクローニングすることができる。実施例の章において、MAS受容体のクローニングで用いることができる方法の詳細な説明が提供される。クローニングが完了したら、MAS受容体の配列は、哺乳動物細胞において活性なプロモーターを持つ発現ベクターへ組み込まれるべきである(Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press (1989))。用いることができるプロモーターの例としては、マウスメタロチオネインI遺伝子のプロモーター(Hamer, et al., J. Mol. Appl. Gen. 1: 273 - 288 (1982)); ヘルペスウイルスの前初期およびTKプロモーター(Yao, et al., J. Virol. 69: 6249 - 6258 (1995)); McKnight, Cell 31: 355 - 365 (1982)); SV40初期プロモーター(Benoist, et al., Nature 290: 304 - 310 (1981)); および、CMVプロモーター(Boshart, et al., Cell 41: 521 - 530 (1985))が挙げられる。また、ベクターは、エンハンサーおよび他の調節要素も含む。

20

【0013】

発現ベクターが構築されたら、例えばリン酸カルシウム沈殿、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポソーム導入、ウイルス導入または粒子媒介遺伝子導入のような方法により、当該ベクターを哺乳動物細胞系に導入することができる。他の哺乳動物細胞を用いることができるが、HEK-293細胞により成功した結果が得られることがわかっており、これらの細胞でMAS受容体を発現させる方法が、実施例の章で説明される。細胞を選択し、MAS受容体の発現に関してそれらを分析する(例えばノーザン分析により)標準的な方法が行われ得る。

30

【0014】

ダイノルフィンA(または類似体)ペプチド、および、ラットおよびヒトMAS受容体を発現する細胞が得られたら、試験化合物が結合に作用を有するかどうかを決定するために分析を行うことができる。当業界周知の標準的な方法を用いて、多種多様な異なるタイプの分析が可能である。例えば、放射性リガンド結合分析において、ダイノルフィンAおよびその類似体と、結合活性に関して試験される化合物と共に、MAS受容体を発現する細胞をインキュベートする。MAS受容体の好ましい源は、組換えにより形質転換されたHEK-293細胞である。ダイノルフィンAおよびその類似体と強く結合する他のタンパク質を発現しないのであれば、他の細胞を用いてもよい。これは、MAS受容体で形質転換された細胞における結合分析を行い、それにより得られた結果と、形質転換されていないそれらの対照を用いて得られた結果とを比較することによって、容易に決定することができる。

40

【0015】

分析は、インタクト細胞、または当該細胞から調製された膜のいずれかを用いて行うことができる(例えば、Wang, et al., Proc. Natl. Acad. Sc

50

i. U.S.A: 90:10230-10234(1993)を参照)。上記で示したように、ダイノルフィンAおよびその類似体と、試験される化合物の調製物と共に、膜または細胞をインキュベートする。結合が完了した後、受容体を、例えば過により、リガンドと試験化合物とを含む溶液から分離し、生じた結合の量を測定する。好ましくは、用いられるリガンドは、放射性同位体(例えば ^{125}I)で検出可能なように標識される。しかしながら、必要に応じて、他のタイプの標識も使用可能である。最も一般的に用いられる蛍光性の標識化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン o - フタルアルデヒド、および、フルオレサミンが挙げられる。有用な化学発光法に用いられる化合物としては、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステルのセロマチック(theromatic)、イミダゾール、アクリジニウム塩、およびシュウ酸エステルが挙げられる。

10

【0016】

非特異的結合は、超過量の標識していないリガンドの存在下での結合反応を行うことによって測定することができる。例えば、1000倍過量の標識していないダイノルフィンAおよび/またはその類似体の存在下で、標識したダイノルフィンAおよびその類似体を、受容体と試験化合物と共にインキュベートすることができる。各試験サンプルに対する特異的結合に到達するためには、非特異的結合は、トータルの結合、すなわち、標識していないリガンドの非存在下での結合から、差し引かれるべきである。必要に応じて、他の工程、例えば洗浄、攪拌、振盪、ろ過などが、分析に含まれてよい。通常、洗浄工程は、溶液中に残留したリガンドから、膜結合リガンドを分離した後、および、例えば放射性同位体を計数することによるリガンド結合量の定量の前に、含まれる。試験化合物の存在下で得られた特異的結合と、標識したリガンド単独の存在下で得られた特異的結合とを比較し、どの程度、試験化合物が受容体結合を置き換えたかを測定する。

20

【0017】

結合分析を行う際に、実際に結合が何らかの他のメカニズムで阻害されている場合に、試験化合物が受容体と相互作用しているように思わせることのある人工物(artifact)が回避されるように注意しなければならない。例えば、試験される化合物は、それ自体が実質的にダイノルフィンAおよびその類似体の結合を阻害しない緩衝液中にあるべきであり、好ましくは、数種の異なる濃度で試験されるべきである。また、試験化合物の調製物は、タンパク質分解の活性に関して試験されるべきであり、抗タンパク質分解酵素が分析物に含まれることが望ましい。最終的に、ダイノルフィンAおよびその類似体の結合を置換すると同定された化合物が、結果のスキッチャード分析を行うのに十分な濃度範囲で再試験されることが、より望ましい。このタイプの分析は当業界周知であり、試験化合物の受容体に対する親和性を測定するのに用いることができる(例えば、Ausubel, et al., Current Protocols and Molecular Biology, 11.2.1-11.2.19(1993); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Work, et al., Ed. N.Y.(1978)を参照)。結果の分析において補助するためにコンピュータープログラムを用いることができる(例えば、Munson, P., Methods Enzymol. 92:543-577(1983))。

30

40

【0018】

ダイノルフィンAおよびその類似体の受容体への結合を阻害する因子は、受容体の活性へのそれらの影響に応じて、アゴニストまたはアンタゴニストのいずれかで有り得る。多数の様々な方法を用いて、受容体の活性化をモニターすることができる。例えば、マイクロタイタープレートのウェル中で細胞を培養し、次に、試験化合物の存在下または非存在下でそのウェルをインキュベートすることでホスホリパーゼC分析を行うことができ、次に、全てのイノシトールリン酸(IP)を樹脂製カラムで抽出し、分析緩衝液中に再懸濁することができる。次に、IP濃度を測定する方法のいずれかを用いて、このようにして回収されたIPの分析を行うことができる。通常、ホスホリパーゼC分析は、結合分析とは

50

別に行われるが、ホスホリパーゼC分析を、1回の細胞の調製に併せて行うこともできる。

【0019】

また、受容体の活性化は、細胞内カルシウム濃度の測定に基づき決定することができ、例えば、形質転換されたHEK-293細胞を、集合体を形成するまでガラス製カバースライド上で培養することもできる。リンスした後、例えばFluo-3、Fluo-4およびFURA-2AM（モレキュラープローブ社製のF-1221）のような因子の存在下で、それらをインキュベートすることができる。リンスおよびさらなるインキュベーションの後、カルシウムの置換を光度計を用いて測定することができる。細胞内カルシウム濃度を測定する他のタイプの分析が当業界周知であり、それらを用いることもできる。

10

【0020】

インバースアゴニストの活性を測定するために、上記受容体の内在性の活性を測定する分析（例えばイノシトールリン酸測定に基づく分析）を用いることができる。アゴニスト活性をブロックするが、それ自身活性は生じさせないアンタゴニストとは異なり、インバースアゴニストは、アゴニストにより生じる応答とは全く反対の生物学的な応答を生じさせる。例えば、アゴニストが細胞内のカルシウムの増加を促進させた場合、インバースアゴニストは、細胞内のカルシウムレベルを減少させる。

【0021】

上述した放射性リガンドおよび細胞の活性化分析は、特定の試験化合物がダイノルフィンAおよびその類似体のヒト/ラットMAS受容体への結合を改変し、アゴニストまたはアンタゴニストとして作用するかどうかを決定するのに用いることができる分析タイプの例を提供する。本発明に適合するこれらの分析に関して多くの改変法がある。このような分析は、受容体へ結合したダイノルフィンAおよびその類似体を検出する手段として標識抗体を用いることも含み、または、本明細書の実施例の章で述べられた蛍光性のイメージングプレートリーダー分析（FLIPR）の形態を採用してもよい。

20

【0022】

【実施例】

I. 方法

クローンラットおよびヒトMAS受容体の調製：

Cell 1986 Jun 6; 45(5): 711-9における記載を参照すること

30

【0023】

発現

HEK-293細胞を、Superfect試薬（キアゲン社製）を用いて、ラットおよびヒトMAS受容体をコードした哺乳動物の発現構築物（pcDNA3.1ベクター、インビトロジェン社製）でトランスフェクトした。MAS受容体の安定な受容体プールを選択マーカー（G418、0.9mg/ml）を適用することによって展開し、その細胞をこの選択培地中で維持した。ノーザンブロット分析と逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）とによって、クローンMAS受容体に特異的なmRNAの存在を評価した。

40

【0024】

リガンド

クローンラットおよびヒトMAS受容体のリガンドを同定するために、ペプチドおよび非ペプチドリガンドのコレクションを市販の源から得た（Sigma, CalBiochem, American Peptide Company, Bachem, RBI, Phoenix）。その化合物を3μmで水/DMSOに溶解し、96ウェルのマイクロプレート中に入れた。総数1000種の化合物（ペプチドおよび非ペプチド）を調製し、試験した。

【0025】

分析

50

1) FLIPR分析

FLIPR (蛍光性のイメージングプレートリーダー、モレキュラーデバイス社製)において、96ウェルのプラットフォーム上で蛍光性カルシウム指示薬のFluo-3 (モレキュラープロブ社製)を用いることにより、機能分析を行った。HEK-293細胞は、受容体を発現するか、または野生型細胞かのいずれかであり、これらに、以下のようにFluo-3をロードした。ラットおよびヒトMAS受容体を発現する安定なHEK-293クローンまたは親細胞を、96ウェルプレート中、1ウェルあたり10,000個の細胞の濃度に培養した。実験の日に、MAS受容体の細胞を、蛍光性溶液(10%ウシ胎仔血清と、4 μ MのFluo-3と、20%プルロニック酸とを含むダルベッコ改変培地)でロードした。その細胞を、加湿したチャンバー内で37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。インキュベーション工程の後、細胞を、20mMのHepesと0.1%BSAとを含むハンクス液(pH7.4)で5回洗浄した。その細胞をFLIPRシステムを用いて分析し、異なる化合物に対する応答に関する細胞内のカルシウムの流動(mobilization)を測定した。

10

【0026】

2) 結合分析

HEK-293細胞の膜は、受容体を発現するか、または野生型細胞かのいずれかであり、これらを上述したように調製し、-80 $^{\circ}$ Cで凍結した。実験の日に、Bouhassira-Homogenizerを用いて、50mMのTRIS/HCl(pH7.4)、5mMのMgCl₂、2mMのEDTA、0.1mMのPMSP、1mg/mlのBSAを含む緩衝液中で、膜をホモジナイズし、異なる¹²⁵I-ダイノルフィンA-NH₂濃度で、1 μ Mの標識されていないダイノルフィンA-NH₂と共に(非特異的結合)、または、それを含まないで(特異的結合)、室温で1時間インキュベートした。

20

【0027】

結合した¹²⁵I-ダイノルフィンA-NH₂を、PEIで予め浸したワットマン社製のGF/Bフィルターによりろ過することによって回収した。そのフィルターを2.5mlの冷Tris/MgCl₂緩衝液で3回リンスし、次に、TopCount NXT(パッカー社製)を用いて計数した。タンパク質をバイオラッド社製の染色試薬を用いて測定した。

30

【0028】

II. 結果

1) FLIPRの結果

HEK-293細胞は、いくつかのGPCR、例えばブラジキニン、およびPACAP受容体を内在的に発現しており、これらは、分析用の内部コントロール(internal control)として用いることができる。全ての化合物を用いて、親HEK-293細胞(トランスフェクトされていない)におけるバックグラウンドシグナルを、FLIPR分析により作製した。クローンMAS受容体を発現するHEK-293細胞を、全ての化合物で刺激し、カルシウム応答を、親HEK-293細胞における応答と比較した。3種の化合物(ダイノルフィンA、ダイノルフィンA-NH₂およびダイノルフィンA1~13)は、形質転換された細胞においては、一貫してシグナルを惹起したが、野生型細胞では惹起しなかった。これは、ダイノルフィンAおよびその類似体が、組換えにより発現した受容体と相互作用することを示す。この結論の確証が、ダイノルフィンAおよびその類似体を用いた用量反応関係の観察により、MAS受容体でトランスフェクトした細胞において得られたが、トランスフェクトされていない細胞、もしくは、他のオーファン受容体でトランスフェクトした細胞においては得られなかった。従って、クローンラットおよびヒトMAS受容体は、ダイノルフィンAおよびその類似体に特異的な受容体であることが立証された。ラットおよびヒトMAS受容体は、ダイノルフィンAおよびその類似体の作用を模擬する化合物(アゴニスト)、または、ダイノルフィンAおよびその類似体の作用を拮抗する化合物(アンタゴニスト)のいずれかをスクリーニングするのに用いることができる。スクリーニング分析は、上述のFLIPR分析を用いて行うことができる。

40

50

【 0 0 2 9 】

2) 結合結果

クローンされた M A S 受容体を発現する H E K - 2 9 3 S の膜は、^{1 2 5} I - ダイノルフィン A - N H ₂ に対する特異的結合を示し、トランスフェクトされていない H E K - 2 9 3 S 膜では特異的結合は観察されなかった。

【 0 0 3 0 】

スクリーニング分析は、上述の結合分析を用いて行うことができる。使用可能な他の分析としては、G T P アーゼ分析、アデニリルシクラーゼ分析、イノシトールリン酸を測定する分析、および、レポーター遺伝子分析（例えば、ルシフェラーゼ、アクエオリン (a q u e o r i n) 、アルカリホスファターゼ等を利用した分析) が挙げられる。

10

【 0 0 3 1 】

ここで引用した全ての参考文献は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。以上、本発明を完全に説明したが、本発明またはそのいずれかの実施態様の本質や範囲に影響を与えることなく、広くかつ同等な範囲の条件、パラメーター等の範囲内で本発明が行われ得ることは、当業者には理解されるであろう。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 July 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/052267 A1

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/566**, C07K 14/665, 14/72
 - (52) International Application Number: PCT/SI01/02854
 - (22) International Filing Date: 19 December 2001 (19.12.2001)
 - (25) Filing Language: English
 - (26) Publication Language: English
 - (30) Priority Data: 60/257,977 22 December 2000 (22.12.2000) US
 - (71) Applicant (for all designated States except US): **ASTRAZENECA AB** [SI/SI]; S-151 85 Södertälje (SE).
 - (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **AHMAD, Sultan** [IN/CA]; AstraZeneca R & D Montréal, 7171 Friederick-Banting, St-Laurent, Quebec H4S 1Z9 (CA). **CRAZZINI, Eric** [FR/CA]; AstraZeneca R & D Montréal, 7171 Friederick-Banting, St-Laurent, Quebec H4S 1Z9 (CA). **LEMBO, Paola** (CA/CA); AstraZeneca R & D Montréal, 7171 Friederick-Banting, St-Laurent, Quebec H4S 1Z9 (CA).
 - (74) Agent: **GLOBAL INTELLECTUAL PROPERTY**; AstraZeneca AB, S-151 85 Södertälje (SE).
 - (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
 - (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:**
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG)
 - of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
 - of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:**
- with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/052267 A1

(54) Title: A METHOD OF ASSAYING FOR AGONISTS OR ANTAGONIST OF DYNORPHIN A BINDING TO THE MAS RECEPTOR

(57) Abstract: The present invention is directed to assays that can be used to screen for compounds that act as agonists or antagonists or inverse agonists of Dynorphin A and its analogues. The assays are based upon the binding of Dynorphin A and its analogues to the rat and human MAS receptors.

WO 02/052267

PCT/SE01/02854

A method of assaying for agonists or antagonists of Dynorphin A binding to the MAS receptor

Field of the Invention

5 The present invention is directed to assay methods that can be used to determine whether a test compound can be used to modulate the binding and activity of Dynorphin A and analogues at the human MAS receptor. Compounds identified as being effective modulators have potential use as therapeutic agents in treating pain, neuropathic and inflammatory disorders, learning and memory, anxiety disorders as well as the regulation of cardiovascular functions.

10 Background of the Invention

A. Dynorphin A

Dynorphin was discovered in 1979 as being an endogenously potent opioid peptide (PNAS, USA 76:6666-6670: 1979). The pharmacological actions of dynorphins are quite vast. Dynorphin A and related peptides have been shown to be moderately effective in non-thermal and mechanical analgesia when administered ICV (Dubner,R., Trends Neurosci. 15:96-103, 15 1992) and have also been used in the clinic for the treatment of intractable pain in cancer patients (Wen, HLL., Central and peripheral endorphins: basic and clinical aspects, New York: Raven Press; 1993:319-323). Dynorphins are also known to have an effect on the cardiovascular system via the central and peripheral nervous systems (Dumont, M. 37:1-33, 20 1996). Moreover, Dynorphin A has an immunomodulatory activity. When administered to mice, Dynorphin A enhanced phagocytosis in the mouse peritoneal macrophages. This phagocytic activity was not inhibited by naloxone treatment suggesting the involvement of a non-opioid receptor (J. Neuroimmunol. 60:37-43, 1995).

Even though, Dynorphin A was first described as a potent opioid peptide with selectivity 25 for kappa opioid receptor, some of its pathological and physiological actions have been proposed to be mediated by non-opioid receptors. Hence, here we described for the first time that Dynorphin A is able to activate and bind to the MAS receptor.

The human MAS oncogene receptor was first isolated in 1986 via a tumorigenicity assay in nude mice (Young, M., Cell, 45:711-719, 1986). This receptor codes for a seven- 30 transmembrane domain protein and within its coding sequence a hallmark feature is present such as the NPY motif in the seventh transmembrane domain. The MAS receptor is expressed in the ventral nervous system (CNS) with highest signal of the mRNA observed in the hippocampus, cortex, cerebellum, piriform cortex and olfactory bulb. The mRNA for this

WO 02/052267

2

PCT/SE01/02854

receptor has also been detected in peripheral tissues including the testis, kidney, and heart (FEBS Letters, 357, 27-32, 1995). The expression of MAS receptor is highly regulated during development and neuronal activity. Interestingly, mice lacking the MAS protooncogene not only displayed an increased anxiety but long-term potentiation was prolonged without affecting the gross morphology of the hippocampus (JBC, 273,11867-11873, 1998).

Hence, drugs targeted at the MAS receptor as agonists, antagonists or inverse agonists could be potentially used for treating problems of long-term memory neuropathic and inflammatory disorders, as well as cardiovascular dysfunction.

B. G Protein-Coupled Receptors

G protein coupled receptors (GPCRs) constitute a family of proteins sharing a common structural organization characterized by an extracellular N-terminal end, seven hydrophobic alpha helices putatively constituting transmembrane domains and an intracellular C-terminal domain. GPCRs bind a wide variety of ligands that trigger intracellular signals through the activation of transducing G proteins (Caron, *et al.*, *Rec. Prog. Horm. Res.* 48:277-290 (1993); Freedman, *et al.*, *Rec. Prog. Horm. Res.* 51:319-353 (1996)).

More than 300 GPCRs have been cloned thus far and it is generally assumed that there exist well over 1,000 such receptors. Roughly 50-60% of all clinically relevant drugs act by modulating the functions of various GPCRs (Gudermann, *et al.*, *J. Mol. Med.* 73:51-63 (1995)). Many of the clinically relevant receptors are located in the central nervous system.

Among the GPCRs that have been identified and cloned is a gene that encodes a protein homologous to the receptors of the DRR/RTA family. We called this receptor MAS receptor and described the structure of the gene as it exists in humans. However, the endogenous ligand for this family of receptors has not previously been identified (Cell: 45, 711-719 1986, JBC 273,11867-11873 1998, WO 99/32519).

Summary of the Invention

The present invention is based upon the discovery that Dynorphin A and its analogues (Dynorphin A-amide and Dynorphin 1-13) activates the rat and human MAS receptor. Recombinant cells expressing either rat or human MAS receptor can be used in conjunction with Dynorphin A and its analogues in screening assays designed to identify agonists inverse agonists and antagonists. Thus, in its first aspect, the invention is directed to a method of assaying a test compound for its ability to bind to the MAS receptor. This is accomplished by incubating cells or membranes expressing the receptor gene with Dynorphin A and its analogues and test compound. The extent to which the binding of Dynorphin A and its

WO 02/052267

3

PCT/SE01/02854

analogues is displaced is then determined. Radioligand assays or enzyme-linked immunosorbent assays may be performed in which either Dynorphin A and its analogues or the test compound is detectably labeled. Although any cell expressing MAS receptor may be used, a recombinant cell expressing a heterologous MAS receptor gene from either the rat or human is preferred. The term "heterologous" as used herein refers to any MAS receptor gene transfected into a cell, *i.e.*, the term refers to any non-endogenous MAS receptor.

The invention also encompasses methods of determining if a test compound is an agonist, antagonist, or inverse agonist of Dynorphin A and its analogues binding based upon a functional assay. One way to carry out such assays is to incubate a cell expressing MAS receptor with the test compound and to then determine whether intracellular phospholipase C, adenylyl cyclase activity or intracellular calcium concentrations are modulated. Results should typically be compared with those obtained when incubations are performed in a similar manner but in the absence of test compound. In general, functional assays of this type will be performed in conjunction with binding assays of the sort described above. The preferred cell for use in the assays is a recombinant cell that has been transformed with a MAS receptor gene. Test compounds that act as agonists should produce an increase in phospholipase C, decrease or increase in adenylyl cyclase activity or increase in intracellular levels of calcium. Inverse agonists may reduce phospholipase C activity or intracellular calcium levels, particularly if assays are performed in the presence of a fixed amount of Dynorphin A and its analogues. Antagonists, should block the binding of Dynorphin A and its analogues to the receptor but not produce the opposite response in terms of phospholipase C activity or intracellular calcium that is the hallmark of an inverse agonist.

Detailed Description of the Invention

The present invention is directed to assays that can be used to screen compounds for their ability to modulate the binding of Dynorphin A and its analogues to the rat and human MAS receptors. Any form of Dynorphin A and its analogues or fragments may be used (Dynorphin A: YGGFLRRIRPKLKWDNQ-COOH or NH₂). Those peptides may be obtained commercially (e.g. Bachem, American Peptide Company) or can be synthesized using standard methodologies well known in the art. The peptide may be detectably labeled with radioisotopes such as ¹²⁵I or, alternatively, fluorescent or chemiluminescent labels can be incorporated. Also, the peptide can be joined to enzymes that are readily detectable such as horseradish peroxidase.

WO 02/052267

PCT/SE01/02854

4

The MAS receptor may be cloned from rat and/or human cells/tissues using the procedure described in Young, M., *Cell*, 45:711-719, 1986. The Examples section provides a detailed description of a procedure that may be used in cloning MAS receptor. Once obtained, the MAS receptor sequence should be incorporated into an expression vector with a promoter
5 active in mammalian cells (Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press (1989)). Examples of promoters that may be used include that of the mouse metallothionein I gene (Hamer, *et al.*, *J. Mol. Appl. Gen.* 1:273-288 (1982)); the immediate-early and TK promoter of herpes virus (Yao, *et al.*, *J. Virol.* 69:6249-6258 (1995); McKnight, *Cell* 31:355-365 (1982)); the SV 40 early promoter (Benoist, *et al.*,
10 *Nature* 290:304-310 (1981)); and, the CMV promoter (Boshart, *et al.*, *Cell* 41:521-530 (1985)). Vectors may also include enhancers and other regulatory elements.

Once expression vectors have been constructed, they can be introduced into a mammalian cell line by methods such as calcium phosphate precipitation, microinjection, electroporation, liposomal transfer, viral transfer or particle mediated gene transfer. Although other
15 mammalian cells may be used, HEK-293 cells have been found to give successful results and a procedure for expressing MAS receptor in these cells is described in the Examples section. Standard procedures for selecting cells and for assaying them for the expression of MAS receptor (*e.g.*, by Northern analysis) may be performed.

Once the Dynorphin A (or an analogue) peptide and cells expressing the rat and human
20 MAS receptors have been obtained, assays may be performed to determine whether test compounds have any effect on binding. A wide variety of different types of assays can be performed using standard methods well known in the art. For example, in radioligand binding assays, cells expressing MAS receptor are incubated with Dynorphin A and its analogues and with a compound being tested for binding activity. The preferred source of MAS receptor is
25 recombinantly transformed HEK-293 cells. Other cells may also be used provided they do not express other proteins that strongly bind Dynorphin A and its analogues. This can easily be determined by performing binding assays on cells transformed with MAS receptor and comparing the results obtained with those obtained using their non-transformed counterparts.

Assays may be performed using either intact cells or with membranes prepared from the
30 cells (*see e.g.*, Wang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:10230-10234 (1993)). As suggested above, the membranes, or cells, are incubated with Dynorphin A and its analogues and with a preparation of the compound being tested. After binding is complete, receptor is separated from the solution containing ligand and test compound, *e.g.*, by filtration, and the

WO 02/052267

5

PCT/SE01/02854

amount of binding that has occurred is determined. Preferably, the ligand used is detectably labeled with a radioisotope such as ¹²⁵I. However, if desired, other types of labels can also be used. Among the most commonly used fluorescent labeling compounds are fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin *o*-phthalaldehyde and fluorescamine. Useful chemiluminescent compounds include luminol, isoluminol, 5 theromatic of acridinium ester, imidazole, acridinium salt, and oxalate ester.

Nonspecific binding may be determined by carrying out the binding reaction in the presence of a large excess of unlabeled ligand. For example, labelled Dynorphin A and its analogues may be incubated with receptor and test compound in the presence of a thousandfold excess of unlabeled Dynorphin A and/or its analogues. Nonspecific binding 10 should be subtracted from total binding, *i.e.*, binding in the absence of unlabeled ligand, to arrive at the specific binding for each sample tested. Other steps such as washing, stirring, shaking, filtering and the like may be included in the assays as necessary. Typically, wash steps are included after the separation of membrane-bound ligand from ligand remaining in 15 solution and prior to quantitation of the amount of ligand bound, *e.g.*, by counting radioactive isotope. The specific binding obtained in the presence of test compound is compared with that obtained in the presence of labeled ligand alone to determine the extent to which the test compound has displaced receptor binding.

In performing binding assays, care must be taken to avoid artifacts which may make it 20 appear that a test compound is interacting with receptor when, in fact, binding is being inhibited by some other mechanism. For example, the compound being tested should be in a buffer which does not itself substantially inhibit the binding of Dynorphin A and its analogues and should, preferably, be tested at several different concentrations. Preparations of test compound should also be examined for proteolytic activity and it is desirable that 25 antiproteases be included in assays. Finally, it is highly desirable that compounds identified as displacing the binding of Dynorphin A and its analogues be reexamined in a concentration range sufficient to perform a Scatchard analysis of the results. This type of analysis is well known in the art and can be used for determining the affinity of a test compound for receptor (*see e.g.*, Ausubel, *et al.*, Current Protocols and Molecular Biology, 11.2.1-11.2.19 (1993)); 30 Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Work, *et al.*, Ed. N.Y. (1978)). Computer programs may be used to help in the analysis of results (*e.g.*, Munson, P., *Methods Enzymol.* 92:543-577 (1983)).

WO 02/052267

PCT/SE01/02854

6

Depending upon their effect on the activity of the receptor, agents that inhibit the binding of Dynorphin A and its analogues to receptor may be either agonists or antagonists. Activation of receptor may be monitored using a number of different methods. For example, phospholipase C assays may be performed by growing cells in wells of a microtiter plate and then incubating the wells in the presence or absence of test compound total inositol phosphates (IP) may then be extracted in resin columns, and resuspended in assay buffer. Assay of IP thus recovered can be carried out using any method for determining IP concentration. Typically, phospholipase C assays will be performed separately from binding assays, but it may also be possible to perform binding phospholipase C assays on a single preparation of cells.

Activation of receptor may also be determined based upon a measurement of intracellular calcium concentration. For example, transformed HEK-293 cells may be grown on glass cover slides to confluence. After rinsing, they may be incubated in the presence of an agent such as Fluo-3, Fluo-4 and FURA-2 AM (Molecular Probe F-1221). After rinsing and further incubation, calcium displacement may be measured using a photometer. Other types of assays for determining intracellular calcium concentrations are well known in the art and may also be employed.

Assays that measure the intrinsic activity of the receptor, such as those based upon inositol phosphate measurement, may be used in order to determine the activity of inverse agonists. Unlike antagonists which block the activity of agonists but produce no activity on their own, inverse agonists produce a biological response diametrically opposed to the response produced by an agonist. For example, if an agonist promoted an increase in intracellular calcium, an inverse agonist would decrease intracellular calcium levels.

The radioligand and cell activation assays discussed above provide examples of the types of assays that can be used for determining whether a particular test compound alters the binding of Dynorphin A and its analogues to the human/rat MAS receptors and acts as an agonist or antagonist. There are many variations on these assays that are compatible with the present invention. Such assays may involve the use of labelled antibodies as a means for detecting Dynorphin A and its analogues that has bound to receptor or may take the form of the fluorescent imaging plate reader assay (FLIPR) as described in the Examples section herein.

Examples

I. Methods

WO 02/052267

PCT/SE01/02854

7

Preparation of Clone Rat and Human MAS receptor:

See description in : Cell 1986 Jun 6;45(5):711-9

Expression

5 HEK-293 cells were transfected with a mammalian expression construct coding for the rat and human MAS receptor (pcDNA 3.1 vector, Invitrogen) using the Superfect reagent (Qiagen). A stable receptor pool of MAS receptor was developed by applying a selection marker (G418, 0.9 mg/ml) and the cells were maintained in this selection medium. The presence of mRNA specific for clone MAS receptor was assessed by Northern blot analysis
10 and by the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

Ligands

In order to identify the ligand of clone rat and human MAS receptor, a collection of peptide and non-peptide ligands was obtained from commercial sources (Sigma, CalBiochem, American Peptide Company, Bachem, RBI, Phoenix). The compounds were dissolved in
15 water/DMSO at 3 μ M and placed in 96 well microplates. A total of 1000 compounds (peptides and non-peptides) were prepared and tested.

Assays

1) FLIPR assay

A functional assay was performed with FLIPR (Fluorescent Imaging Plate Reader,
20 Molecular Devices) using the fluorescent calcium indicator Fluo-3 (Molecular Probes) on a 96 well platform. HEK-293 cells, either expressing the receptor or wild type cells, were loaded with Fluo-3 as follows. Stable HEK-293 clones expressing rat and human MAS receptor or parental cells were plated at a density of 10,000 cells/well in a 96 well plate. On the day of the experiment, the MAS receptor cells were loaded with fluorescent solution (Dulbecco's
25 modified medium with 10% fetal bovine serum containing 4 μ M Fluo-3 and 20% pluronic acid). The cells were incubated at 37°C for one hour in a humidified chamber. Following the incubation step, cells were washed five times in Hanks' with 20 mM Hepes and 0.1% BSA (pH 7.4). The cells were analyzed using the FLIPR system to measure the mobilization of intracellular calcium in response to different compounds.

30 2) Binding assay

Membranes of HEK-293 cells, either expressing the receptor or wild type cells were prepared as previously described and frozen at -80°C. On the day of the experiment membranes were homogenized in a buffer containing 50 mM TRIS/HCl pH 7.4, 5mM MgCl₂,

WO 02/052267

8

PCT/SE01/02854

EDTA 2mM, PMSF 0.1mM, BSA 1mg/ml using a B Dounce homogenizer and incubated 1 hour at room temperature with different concentrations of ^{125}I -Dynorphin A-NH2 and with (non-specific binding) or without (specific binding) 1 μM of non-labelled Dynorphin A-NH2.

5 The ^{125}I -Dynorphin A-NH2 bound was collected by filtration through Whatman GF/B filters presoaked in PEI. The filters were rinsed three times with 2.5 ml of the cold Tris/MgCl₂ buffer and then counted using a TopCount NXT (Packard). Protein was measured using a Bio-Rad dye reagent.

II. Results

1) FLIPR Results

10 HEK-293 cells endogenously express some GPCRs such as bradykinin and PACAP receptors which can be used as internal controls for assays. The background signal was established with all of the compounds in the parental HEK-293 cells (non-transfected) using the FLIPR assay. HEK-293 cells expressing the clone MAS receptor were stimulated with all compounds and calcium responses were compared with those in parental HEK-293 cells.

15 Three compounds, (Dynorphin A, Dynorphin A -NH2 and Dynorphin A 1-13), consistently elicited signals in the transformed cells but not in the wild type cells. This indicates that Dynorphin A and its analogues are interacting with the recombinantly expressed receptors. Confirmation of this conclusion was obtained by the observation of a dose-response relationship with Dynorphin A and its analogues in the cells transfected with MAS receptor, but not in the non-transfected cells or in cells transfected with other orphan receptors. Thus, it has been established that clone rat and human MAS receptor are specific receptors Dynorphin A and its analogues. The rat and human MAS receptors can be used to screen compounds which either mimic the action of Dynorphin A and its analogues (agonists) or antagonize the action of Dynorphin A and its analogues (antagonists).

25 Screening assays can be performed using the FLIPR assay described above.

2) Binding Results

HEK 293S membranes expressing the cloned MAS receptor showed specific binding for ^{125}I -Dynorphin A-NH2. No specific binding was observed in untransfected HEK 293S membranes.

30 Screening assays can be performed using binding assay described above. Other assays that can be used include the GTPase assay, adenylyl cyclase assays, assays measuring inositol

WO 02/052267

9

PCT/SE01/02854

phosphates, and reporter gene assays (e.g., those utilizing luciferase, aequorin, alkaline phosphatase, etc.).

All references cited herein are fully incorporated by reference. Having now fully described the invention, it will be understood by those of skill in the art that the invention may
5 be performed within a wide and equivalent range of conditions, parameters and the like, without affecting the spirit or scope of the invention or any embodiment thereof.

CLAIMS

1. A method of assaying a test compound for its ability to bind to the rat and human MAS receptor receptors, comprising:
 - a) incubating a cell expressing the MAS receptor gene with Dynorphin A and its analogues, and said test compound; and
 - b) determining the extent to which the binding of said Dynorphin A and its analogues are displaced by said test compound.
2. The method of claim 1, wherein said cell expressing rat /human MAS receptor is a recombinant cell that has been transformed with a heterologous MAS receptor gene.
3. The method of claim 1, wherein said assay is a radioligand assay and said Dynorphin A and its analogues or said test compound is radioactively labeled.
4. The method of claim 1, wherein said assay is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and either said Dynorphin A and its analogues or said test compounds are joined to an enzyme.
5. The method of any one of claims 1-4, further comprising determining whether said test compounds significantly increase or decrease either the phospholipase C or intracellular calcium concentration of said cell.
6. A method of determining if a test compound is an agonist, antagonist or inverse agonist of Dynorphin A and its analogues, comprising:
 - a) incubating a cell expressing MAS receptor with said test compounds;
 - b) determining the intracellular phospholipase C or adenylyl cyclase activity or intracellular concentration of calcium of said cell during the incubation of step a);
 - c) comparing the results obtained in step b) with the results obtained when incubations are performed in the absence of said test compound; and
 - d) concluding that said test compound are agonist of Dynorphin A and its analogues if the level of phospholipase C or adenylyl cyclase activity or intracellular calcium is significantly higher in the presence of said test compounds than in its absence, or concluding that said test compounds are antagonist of Dynorphin A and its analogues if the level of phospholipase C or adenylyl cyclase activity or intracellular calcium concentration is significantly lower in the presence of said test compounds than in its absence.
7. The method of claim 6, wherein said cell is a recombinant cell that has been transformed with a heterologous MAS receptor gene (rat and human).

WO 02/052267

11

PCT/SE01/02854

8. The method of either claim 6 or claim 7, wherein said cell expressing MAS receptor and test compound are incubated in a medium further comprising Dynorphin A and its analogues

WO 02/052267

1/1

PCT/SE01/02854

SEQUENCE LISTING

<110> AstraZeneca AB
5
<120> ASSAYS

<130> 1000251

10 <150> US 60/257,977
<151> 2000-12-22

<160> 1

15 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 17
<212> PRT
20 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetically generated peptide

25 <400> 1
Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Lys Trp Asp Asn
1 5 10 15
Gln

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 01/02854
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: G01N 33/566, C07K 14/665, C07K 14/72 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: G01N, C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI DATA, EPO-INTERNAL, BIOSIS, MEDLINE, CHEM. ABS DATA, EMBASE, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9932519 A1 (ASTRA AKTIEBOLAG), 1 July 1999 (01.07.99), page 20, lines 18-19; claim 42 --	1-8
A	J Mol Cell Cardiol, Vol. 28, 1996, Michel Dumont et al: "Interactions of Dynorphin A and Related Peptides with Cardiac Ouabain Binding Sites", page 615 - page 621, page 619, 2nd column, last paragraph --	1-8
A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, no. 19, May 1998, Thomas Walther et al: "Sustained Long Term Potentiation and Anxiety in Mice Lacking the Mas Protooncogene", page 11867 - page 11873, page 11873, 1st column --	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 April 2002		24-04-2002
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Ida Christensen/EÖ Telephone No. +46 8 782 25 00

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 01/02854
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J Neurophysiol., Vol. 83, no. 4, 2000, Oliver von Bohlen et al: "Interaction Between Mas and the Angiotensin AT1 Receptor in the Amygdala", page 2012 - page 2021, abstract; page 2012 1st column --	1-8
A	Journal of Neuroimmunology, Vol. 60, 1995, Mitsuyuki Ichinose et al: "Enhancement of phagocytosis by dynorphin A in mouse peritoneal macrophages", page 37 - page 43, page 42, 2nd column, last paragraph -- -----	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No. PCT/SE 01/02854	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO	9932519 A1	01/07/99	AU	1990499 A	12/07/99
			BR	9814335 A	10/10/00
			CA	2316280 A	01/07/99
			CN	1284966 T	21/02/01
			EP	1051434 A	15/11/00
			JP	2001526064 T	18/12/01
			NO	20003221 A	10/08/00
			PL	341524 A	23/04/01
			SE	9704836 D	00/00/00
			SK	8752000 A	18/01/01
			TR	200001861 T	00/00/00

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
// A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 33/58	Z

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 エリック・グラッツィーニ

カナダ国ケベックH 4 S 1 Z 9 . サンローラン . フレデリック - バンティング7 1 7 1 . アスト
ラゼネカ・アール・アンド・ディー・モンリオール

(72) 発明者 パオーラ・レムボー

カナダ国ケベックH 4 S 1 Z 9 . サンローラン . フレデリック - バンティング7 1 7 1 . アスト
ラゼネカ・アール・アンド・ディー・モンリオール

F ターム(参考) 2G045 BB14 BB20 BB50 CB01 DA36 FB01 FB03 FB12 GC15
4B063 QA05 QQ33 QQ89 QQ91 QR77 QS24 QS28
4C084 AA16 DC50 ZA01 ZA05 ZA08 ZA15 ZA36 ZA39 ZA40 ZA41
ZA42 ZA44 ZA45

专利名称(译)	分析强啡肽A与MAS受体结合的激动剂或拮抗剂的方法		
公开(公告)号	JP2004516036A	公开(公告)日	2004-06-03
申请号	JP2002553115	申请日	2001-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	阿斯利康(瑞典)有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿斯利康Akuchieboragu		
[标]发明人	サルタンアーマツド エリックグラッツィーニ パオーラレムポー		
发明人	サルタン・アーマツド エリック・グラッツィーニ パオーラ・レムポー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/22 A61P25/28 A61P29/00 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/58 G01N33/94		
CPC分类号	A61P25/00 A61P25/04 A61P25/22 A61P25/28 A61P29/00 G01N33/5005 G01N33/9406 G01N33/9486 G01N2333/665 G01N2333/726 G01N2333/916 G01N2333/988 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA A61P9/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/22 A61P25/28 A61P29/00 G01N33/53.D A61K45/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/58.Z		
F-TERM分类号	2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 4B063/QA05 4B063/QQ33 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QS28 4C084/AA16 4C084/DC50 4C084/ZA01 4C084/ZA05 4C084/ZA08 4C084/ZA15 4C084/ZA36 4C084/ZA39 4C084/ZA40 4C084/ZA41 4C084/ZA42 4C084/ZA44 4C084/ZA45		
代理人(译)	西村 公佑 杉本博司		
优先权	60/257977 2000-12-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及可用于筛选充当强啡肽A及其类似物的激动剂或拮抗剂或反向激动剂的化合物的测定法。该测定基于强啡肽A及其类似物与大鼠和人MAS受体的结合。

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
 International Bureau

(43) International Publication Date
 4 July 2002 (04.07.2002)

(51) International Patent Classification⁷
 G01N 33/566
 C07K 146605, 14672

(21) International Application Number:
 PCT/US01/02854

(22) International Filing Date:
 19 December 2001 (19.12.2001)

(23) Filing Language:
 English

(24) Publication Language:
 English

(30) Priority Data:
 60/257,977 22 December 2000 (22.12.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
 AstraZeneca AB (SE0981); SE 181 90 Södertälje (SE)

(72) Inventor(s) and
 Inventor/Applicant (for US only):
 AHMAD, Sofian (FR001), Avenue Jean R. de la Motteville, 71211 Roubaix
 Building, St Laurent, Quebec, H4S 1Z9 (CA);
 CHAZZINI, Eric (FR001), Avenue Jean R. de la Motteville, 71211 Roubaix
 Building, St Laurent, Quebec, H4S 1Z9 (CA);
 LEMBEK, Danka (CA001), Avenue Jean R. de la Motteville, 71211 Roubaix
 Building, St Laurent, Quebec, H4S 1Z9 (CA).

(74) Agent:
 GLOBAL INTELLECTUAL PROPERTY, Av-
 enue Jean R. de la Motteville (SE)

(81) Designated States (national):
 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GR, GT, HK, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SV, TH, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (epitome):
 ARIPO patent: GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SF, SZ, TZ, UG, ZM, ZW.
 European patent: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, JP, KR, LK, LU, NL, NO, NZ, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, SL, SV, TH, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
 International patent: AM, AZ, BZ, EG, GZ, GD, GE, GR, GT, HK, IL, IN, JP, KR, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, SL, SV, TH, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
 Patent Cooperation Treaty (PCT): AU, BR, CA, CN, CO, CZ, DE, DK, DM, DO, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GT, HK, IL, IN, JP, KR, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, SL, SV, TH, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
 World Intellectual Property Organization (WIPO): AU, BR, CA, CN, CO, CZ, DE, DK, DM, DO, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GT, HK, IL, IN, JP, KR, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, SL, SV, TH, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(54) Title:
 A METHOD OF ASSAYING FOR AGONISTS OR ANTAGONISTS OF DYNORPHIN A BINDING TO THE MAS RECEPTOR

(57) Abstract:
 The present invention is directed to assays that can be used to screen for compounds that act as agonists or antagonists or inverse agonists of Dynorphin A and its analogues. The assays are based upon the binding of Dynorphin A and its analogues to the rat and human MAS receptors.

WO/02/052267 A1